مطالعه تغییرات بیان ژن Zrt1 در مخمر ساکارومایسس سرویزیه تحت تاثیر غلظت های مختلف روی در محیط

فروغ سرائی[۱]، کیومرث امینی[۲*]، اعظم حدادی[۱] و محدثه لاری پور[۳]

[۱] ایران، کرج، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، دپارتمان میکروبیولوژی

[۲] ایران، ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، دانشکده علوم، دپارتمان میکروبیولوژی

[۳] ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم زیستی، دپارتمان میکروبیولوژی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۰۹

چکیده

مخمر *ساکارومایسس سرویزیه*(*Saccharomyces cerevisiae*) ، اثر مهمی در جذب فلزات سمی دارد و پروتئین ناقل روی Zrt1 به جذب روی خارج سلولی توسط مخمر کمک می کند. بنابرین، تغییرات بیان ژن Zrt1. مخمر*S. cerevisiae* به عنوان یک سویه مهم صنعتی، تحت تاثیر غلظت های مختلف روی در مطالعه حاضر مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا از نمونه حاصل از پسماند کارخانه تولید الکل، مخمر *S. cerevisiae* با استفاده از روش PCR و تعیین توالی DNA و رسم درخت فیلوژنی شناسایی شد. سپس، میزان رشد این مخمر در حضور روی و در فواصل ۲۴ ساعته با استفاده از روش جذب نوری بررسی شد. از روش qRT-PCR نیز برای تعیین میزان بیان ژنZrt1 در مخمر تحت تاثیر غلظت های مختلف روی موجود در محیط کشت، استفاده شد. در نهایت، با STRING و نرم افزار بیوانفورماتیکی Cytoscape شبکه پروتئینی مربوط به ژنZrt1 ترسیم و آنالیز شد. در شرایطی که غلظت روی در محیط به مقدار ۲۵ µg/ml مدت گرماگذاری ۲۴ ساعت بود، *S. cerevisiae* حداکثر سرعت رشد و میزان بیان ژن Zrt1 را به عنوان ناقل روی نشان داد. با آنالیز شبکه پروتئینی نیزZrt1 به عنوان مهمترین پروتئین موجود در این شبکه در مسیر سیگنالدهی درون سلولی در جذب روی شناخته شد. ژن Zrt1 اهمیت زیادی در جذب روی توسط مخمر *S. cerevisiae* به ویژه در شرایط کمبود روی در محیط دارد و نیز می توان از پساب های صنعتی برای بدست آوردن میکروارگانیسم هایی با توانایی جذب فلزات در پاکسازی محیط زیست و حتی تولید توده زیستی غنی شده با این فلزات استفاده کرد.

واژگان کلیدی: مخمر *ساکارومایسس سرویزیه*، فلز روی، جذب زیستی، ژن Zrt1

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۶۴۲۴۳۳۳۴۲، پست الکترونیکی: kumarssaminia@gmail.com

مقدمه

با سرعت گرفتن رشد صنعت در جهان، کیفیت آب، غذا، خوراک و آب و هوا نیز تحت تأثیر قرار گرفته است، که این امر در نتیجه رها شدن مقادیر بالایی از آلاینده ها، حاصل از صنایع مختلف به محیط زیست می باشد. در این میان، فلزات سنگین به عنوان نوع اصلی این آلاینده ها به دلیل تجمع در آب و غذا و در نتیجه تأثیر بر اندام ها و بافت های انسانی، بطور قابل توجهی ایمنی غذا را تهدید می کنند (۱۳, ۱۸).

از میان فلزات سنگین که به سه دسته فلزات سمی، فلزات گرانبها و رادیونوکلئیدها طبقه بندی می شوند، فلز روی(Zinc) از جمله فلزات سمی به شمار می رود که نقش مهمی در آلودگی آب دارد(۲۵). از آنجا که این فلز

به عنوان عنصری اساسی در بخش های صنعتی متعددی مورد استفاده است، مقادیر زیادی از این فلز سنگین در پساب های صنعتی تخلیه می شود. فلز روی از نظر زیستی نیز دارای اهمیت بسیاری است. این فلز به عنوان یون اصلی در ساختار موتیف های پروتئینی، عامل کاتالیستی در بسیاری از آنزیم ها و عامل ساختاری و عملکردی در اسیدنوکلئیک ها و پروتئین ها ایفای نقش می کند. فلز روی همچنین در بیان بسیاری از ژن ها و نیز توسعه سیستم ایمنی بدن دخالت دارد. بنابراین، کمبود روی به اختلال در عملکرد ایمنی ذاتی و عملکرد سلول های کشنده طبیعی منجر می شود (۹, ۲۸, ۳).

میکروارگانیسم ها نیز همانند انسان، برای واکنش های حیاتی خود به سطح مناسب روی وابسته اند. به طوری که تحقیقات نشان می دهد حدود ۴۰۰ ژن دخیل در رشد میکروارگانیسم وابسته به روی است. تحقیقات متعددی به طور عمده در مخمر ساکارومایسس سرویزیه(*Saccharomyces cerevisiae*) انجام شده است، که بیانگر نیاز به هموستاز روی در رشد و متابولیسم این مخمر است(۱۷, ۳). به طور کلی دو گروه اصلی ناقلین روی یوکاریوتی در *S. cerevisiae* وجود دارد، شامل: گروه پروتئین های ZIP (Zrt1، Zrt2 و Zrt3) و گروه تسهیل کننده انتشار کاتیونی (Zrc1،Cot1، Msc2 وZrg1). در شرایط محدودیت شدید روی، جذب روی خارج سلولی در *S. cerevisiae* با واسطه پروتئینZrt1 با تمایل بالا به جذب روی صورت می گیرد، که در این شرایط بیان ژن Zrt1 تا ۳۰ برابر نیز افزایش می یابد(۲۹, ۷, ۳۰)

با وجود ظرفیت متوسط، *S. cerevisiae* یک میکروارگانیسم منحصر به فرد در جذب فلزات سنگین است، که در سال های اخیر بمنظور حل مشکل آلودگی فلزات سنگین و در نتیجه اصلاح محیط زیست، مورد توجه محققان قرار گرفته است(۲). از آنجا که این مخمر دارای قابلیت کشت آسان در مقیاس بزرگ و دستکاری در سطح مولکولی می باشد و همچنین توانایی تولید بیومس فراوان دارد، از دیدگاه تولید مواد زیستی مورد توجه قرار گرفته است(۲۶).

مخمرها می توانند محصولات فرعی آلی صنعتی ارزان قیمت و در دسترس را به پروتئین و لیپیدهای با کیفیت بالا تبدیل کنند، که در خوراک دام و مصرف انسانی کارآمد هستند(۲۴). بعلاوه، به دلیل توانایی مخمر در اتصال به یون های فلزی موجود در محیط کشت، می توان از آنها به عنوان منبع تولید پروتئین غنی شده با مواد معدنی استفاده کرد، تا به راحتی توسط انسان قابل مصرف باشند(۱). در مطالعه حاضر با استفاده از مخمر*S. cerevisiae* به عنوان یک سویه مهم صنعتی، به دست آمده از فاضلاب کارخانه تولید الکل، به بررسی بیان ژن Zrt1 که نقش اصلی را در جذب روی توسط این مخمر دارد، می پردازیم. در این مطالعه تغییرات بیان این ژن در مخمر مورد نظر تحت تاثیر غلظت های مختلف روی موجود در محیط کشت بررسی می شود.

مواد و روشها

جمع آوری نمونه و کشت مخمرهای جداسازی شده: نمونه های به دست آمده از فاضلاب صنعتی کارخانه تولید الکل سیمین تاک (قزوین، ایران) در ظروف شیشه ای استریل جمع آوری و درب ظروف محکم بسته شد و برای بررسی های بیشتر به آزمایشگاه منتقل شد. بمنظور جداسازی میکروارگانیسم ها ابتدا نمونه های پساب با عبور از کاغذ فیلتر با اندازه منافذ ۰/۴۵ میکرومتر فیلتر شدند. سپس کاغذهای فیلتر که اکنون حاوی میکروارگانیسم های پساب بودند، به محیط کشت مایع SDB (Sabouraud Dextrose Broth) که محیط مایع مخصوص رشد قارچ هاست و حاوی پپتون قارچی و دکستروز می باشد، انتقال داده شدند. محیط کشت SDB پس از آماده سازی، به کمک اتوکلاو در دمای ۱۲۱درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه استریل گردید. این محیط کشت به منظور رشد

مخمر و عدم رشد باکتری ها و جداسازی نمونه ها تهیه شد. پس از قرار دادن فیلتر در این محیط کشت، محیط در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ روز گرماگذاری گردید (تصاویر مربوط به نمونه های فاضلاب جداسازی شده و کشت داده شده در شکل۱آمده است). در مرحله بعد، مخمرها که به کمک محیط کشت SDB جداسازی و رشد داده شده بودند، در پلیت های حاوی محیط کشت YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium) حاوی کلرامفنیکل، گلوکز، پپتون سویا، استروپتومایسن سولفات و عصاره مخمر کشت داده شدند. محیط کشت YPDمحیطی مغذی برای رشد مخمرها می باشد که به علت وجود کلرامفنیکل مانع از رشد ارگانیسم ها به جز قارچ ها (از جمله مخمرها) می شود. محیط کشت جامد ساخته شد و در دمای۱۲۱ درجه سلسیوس و به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو استریل گردید. پس از کشت نمونه ها در این محیط، محیط کشت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس و به مدت ۳ روز انکوبه گردید.

شکل ۱- نمونه های فاضلاب جداسازی شده و کشت داده شده. A : نمونه فاضلاب جداسازی شده،به رنگ کدر وقهوه ای مشخص است : B جداسازی مخمرها از نمونه فاضلاب به روش فیلتراسیون ، C: قرار دادن فیلتر در محیط SDB جهت رشد مخمرهای موجود در فاضلاب

شناسایی مخمر *S. cerevisiae* از میان نمونه های کشت داده شده: بمنظور شناسایی و جداسازی مخمر *S. cerevisiae* از بررسی های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و ملکولی استفاده شد.

بررسی مورفولوژیکی مخمر. شناسایی مخمرها براساس استاندارد مرجع شناسایی مخمرها یعنی چاپ پنجم کتاب'The Yeasts, A Taxonomic Study' انجام شد(۱۰). در بررسی مورفولوژیکی کلنی، ویژگی هایی چون رنگ و شکل کلنی، بافت و حاشیه کلنی و همچنین شکل سلول مخمر مشخص گردد. برای بررسی مورفولوژیکی کلنی مخمر، مخمرها بر روی محیط YPD جامد کشت داده شدند و سپس ویژگی های ظاهری کلنی ها در پلیت بررسی شدند. همچنین برای بررسی شکل سلول مخمر، مخمر توسط رنگ آمیزی ساده کریستال ویوله رنگ آمیزی شد و از لحاظ مرفولوژی سلول بررسی گردید.

بررسی بیوشیمیایی مخمر. از آنجا که مخمرها در توانایی تخمیر قندها با هم متفاوتند، در شناسایی بیوشیمیایی مخمر *S. cerevisiae* قابلیت تخمیر قندها مورد بررسی قرار گرفت. تخمیر قندها به وسیله تولید گاز دی اکسید کربن و تجمع آن در داخل لوله دورهام اندازه گیری شد. به این ترتیب که ابتدا جهت تهیه سوسپانسیون، یک لوله آزمایش محتوی محیط YPD مایع آماده و یک کلنی از YPD جامد در آن تلقیح گردید. سپس در داخل انکوباتور به مدت ۲۴ساعت قرار داده شد تا رشد کند و به عنوان محیط تلقیح مورد استفاده قرار گیرد. تهیه لوله های آزمایش محتوی محیط کشت YEP حاوی قند های مختلف جهت بررسی تخمیر قندها به این صورت انجام شد که ابتدا به تعداد قندهای مورد بررسی، لوله های آزمایش فراهم شد و ۲ گرم از قندهای مورد آزمایش، شامل:

D- مالتوز،L- آرابینوز،D- گالاکتوز، سوکروز، D- زایلوز،D-مانیتول، لاکتوز و D- سلبیوز وD- رافینوز

(به جز رافینوز که ۴g می باشد، چون برخی سویه ها فقط قسمتی از این مولکول را مصرف می کنند) به همراه ۱ گرم از عصاره مخمر و ۲ گرم پپتون در۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد و توسط فیلتر استریل گردید. سپس لوله های دورهام کوچک به صورت وارونه در داخل محیط قرار گرفت و در دمای ۱۱۰ درجه سلسیوس به مدت۱۰دقیقه اتوکلاو شد، تا لوله های دورهام به پایین بروند و در ته قرار بگیرند. به لوله های محتوی محیط قندی به میزان ۱٪ از محیط کشت YPD مایع که حاوی سویه های کشت داده شده بود، تلقیح گردید. لوله ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس برای مدت زمان ۲۸روز انکوبه شدند و در این مدت کدورت محیط و لوله های دورهام از نظر تجمع گاز داخل آنها بررسی شدند. سپس نتایج به صورتی که در ادامه آمده است، خوانده شدند(۱۰):

- مثبت قوی: لوله دورهام پر شده از گاز تا ۷ روز
- مثبت تاخیری: لوله دورهام پر شده از گاز به صورت سریع پس از ۷ روز
- مثبت کم: لوله دورهام پر شده از گاز به آرامی پس از۷ روز
- مثبت ضعیف: کمتر از ۱/۳ لوله دورهام با گاز پر شده
- منفی: لوله دورهام بدون پر شدن گاز
- متغیر: برخی سویه ها + و برخی دیگر – هستند

بررسی ملکولی مخمر. برای شناسایی دقیق تر مخمر *S. cerevisiae* از روش شناسایی ملکولی مخمر و رسم درخت فیلوژنی استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا DNA مخمرها توسط کیت اختصاصی استخراج DNA قارچ و مخمر با نام تجاری (PGA Yeast (PGA No. PF230-050 and Fungi DNA Extraction kit طبق مراحل گفته شد در کیت، استخراج شد. سپس از روش متداول واکنش PCR به کمک پرایمرهای ITS1 وITS4 (تهیه شده از شرکت سیناکلون) برای تکثیر ژن 18srRNA مخمر استفاده گردید(۱۴). ترکیبات ویال واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر آماده شد که شامل۲۵ میکرولیتر از مستر میکس فیوژن x۲، ۱ میکرولیتر ازDNA نمونه و ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای ITS1 و ITS4 و ۲۲ میکرولیتر آب DEPC بود.

پس از آماده سازی ترکیب، میکروتیوب های آماده شده در دستگاه (Eppendorf AG22331) برای انجام واکنش PCR قرار گرفت. مراحل واکنش برای تکثیر ژن 18srRNA در شرایط فعال سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، در ۳۵ سیکل (شامل واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱دقیقه، اتصال پرایمرها در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت۱دقیقه و بسط در دمای۷۲ درجه سلسیوس به مدت۲ دقیقه) و در نهایت بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت۱۰دقیقه تنظیم شد. برای مشاهده محصول PCR ، ابتدا ۰/۲گرم از پودر آگارز (Merck, Germany) در ۲۰ میلی لیتر از محلول 5x TBE حل شد و پس از حرارت و انحلال کامل، با کاهش دمای ژل، ۱ میلی لیتر از محلول DNA Safe Stain به منظور مشاهده باندها در مقابل اشعه فراء بنفش به ژل افزوده شد. به این ترتیب ژل آگارز ۱٪ تهیه و نمونه ها بر روی این ژل به کمک تانک الکتوفورز لود شدند. در نهایت نتیجه با دستگاه Gel-Documentation مورد بررسی قرار گرفت. پس از مشاهده باند مورد نظر، محصول PCR برای تعیین توالی به شرکت Bioneer در کشور کره ارسال شد. توالی خوانش شده از طریق بانک اطلاعاتی (National Center for Biotechnology Information NCBI) با سایر ژن های موجود مقایسه شد و توالی مشابه یافت شد و برای رسم درخت فیلوژنی مخمرهای شناسایی شده به عنوان *S. cerevisiae* نیز از نرم افزار MEGA7.0براساس روش Neighbour-joining استفاده شد(۵).

بررسی تاثیر غلظت های مختلف فلز روی بر میزان رشد

مخمر: پس از شناسایی مخمر مورد نظر، تأثیر غلظت های مختلف روی بر میزان جذب روی توسط مخمر و همچنین میزان بهره وری از آن در جهت تولید توده زیستی از مخمر در حال رشد، مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا محلول $ZnSO_4$ ، با استفاده از محلول استوک استریل سولفات هپتاهیدرات روی (Merck, Germany) تهیه شده با غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر، آماده سازی شد. سپس از استوک آماده شده رقت های مختلفی به ارلن مایرهای حاوی ۲۰۰ میلی لیتر محیط کشت SDB ، اضافه شد. بطوریکه غلظت روی در ارلن های مختلف شامل۰ ، ۲۵ ، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در محیط کشت تنظیم گردید. سپس ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون مخمر حاوی مقدار تقریبی $۱/۵ \times ۱۰^{۷}$ سلول بر میلی لیتر به این محیط های کشت حاوی روی تلقیح شدند. محتوای کلیه ارلن ها (کنترل و آزمایش) در شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس و سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شدند. pH پایه محیط نیز بر روی ۵/۸ تنظیم شده بود.

در طول کشت مخمر با حضور روی، رشد مخمر در فواصل ۲۴ ساعته (۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲) مورد سنجش قرار گرفت. چگالی نوری (Optical Density: OD) سوسپانسیون هر ارلن (ترکیبی از محیط کشت SDB حاوی روی به همراه مخمر) با استفاده از روش طیف سنجی در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شد. همچنین ۱۰ میلی لیتر از این سوسپانسیون در دمای ۲۰ درجه سلسیوس با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس محلول روئی دور ریخته شد و رسوب باقیمانده سه مرتبه با آب دوبار تقطیر شستشو داده شد تا باقیمانده محیط کشت و روی باند شده به سطح سلول، حذف شود. پس از آن، برای تعیین وزن بیومس خشک، از یک روش خشک کردن دو مرحله ای استفاده گردید. بدین ترتیب که ابتدا نمونه ها به مدت ۲ ساعت تحت دمای ۶۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند و سپس در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس تا رسیدن به وزن ثابت نگهداری شدند(۱۲). در پایان توده زیستی خشک وزن شد و بعنوان وزن خشک سلول (Cell Dry Weight :CDW) در نظر گرفته شد. بازده توده زیستی سلول های مخمر براساس گرم وزن خشک در لیتر محیط کشت گزارش می شود (ما نیز نتایج را بر اساس ۲۰۰ میلی لیتر محیط کشت گزارش کردیم). بدین ترتیب تاثیر غلظت های مختلف فلز روی بر میزان رشد مخمر مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی تاثیر روی جذب شده بر بیان ژن Zrt1 در مخمر با استفاده از روش qRT-PCR

استخراج RNA. در این مرحله برای بررسی تاثیر روی جذب شده بر میزان بیان ژن Zrt1 در مخمر ابتدا استخراج RNA از مخمرهای هر گروه با استفاده از کیت استخراج RNA قارچی با نام تجاری EZ-10 Spin Column Fungal RNA Mini-Preps Kit (Bio Basic, BS91915) برطبق مراحل ذکر شده در کیت، انجام شد.

ارزیابی کمّی RNA و ساخت cDNA. برای اندازه گیری کمّی RNA به دست آمده از دستگاه نانودراپ با نام تجاریDenovix استفاده شد. این دستگاه میزان جذب نوری پروتئین، اسید نوکلئیک و فنول را بترتیب در طول موج های ۲۸۰، ۲۶۰ و۲۳۰ نانومتر نشان می دهد. از نسبت طول موج های ۲۳۰/ ۲۶۰ و ۲۶۰/۲۸۰ برای بررسی میزان خلوص هر نمونه استفاده می شود. ۱/۵ میکرولیتر از RNA بدست آمده توسط این دستگاه مورد ارزیابی قرار گرفت و با توجه به اینکه نسبت جذب در ۲۶۰ به جذب در۲۸۰ نانومتر برای نمونه ها در محدوده تقریبی ۱/۸ تا ۲/۱ بود، از خلوص RNA استخراج شده اطمینان حاصل شد. سپس برای ساخت cDNA از Tetro cDNA Synthesis Kit (BIO-65042 Bioline) استفاده شد. به این ترتیب که ۳ میکرولیتر از RNA با افزودن ۱۷ میکرولیترآب DEPC به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده شد و سپس محلول حاصل به میکروتیوب موجود در کیت که حاوی دیگر مواد لازم

جهت سنتز cDNA بود، افزوده شد. با چندین مرتبه پیپت کردن، محتویات میکروتیوب به خوبی با هم مخلوط شد و سپس ترکیب حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از این مدت میکروتیوب در دستگاه Palm-Cycler که بر روی دمای۴۵ درجه سلسیوس و مدت زمان۶۰ دقیقه تنظیم شده بود، قرار داده شد. cDNA سنتز شده در مرحله qRT-PCRمورد استفاده قرار گرفت(۲۰).

واکنش qRT-PCR برای بررسی میزان بیان ژن Zrt1 . بررسی بیان ژن Zrt1 به کمک واکنش qRT-PCR انجام شد. جفت پرایمر:

Forward: 5′ AAATGCACTAGAACATGGCG 3′
Reverse: 5′ TTCATGACTATTTAAATGCCTT 3′

به عنوان پرایمرهای اختصاصی ژن Zrt1 به کار برده شد. همچنین از جفت پرایمر:

Forward: 5′ AAACGGCTACCACATCCAAG 3′
Reverse: 5′ CCCATCCCAAGGTTCAACTA 3′

برای تکثیر ژن18SrRNA بعنوان ژن کنترل داخلی در واکنش qRT-PCR استفاده شد. در واقع کنترل داخلی ژنی است که به دلیل پایداری و میزان بیان ثابتی که دارد، برای نرمال کردن داده ها مناسب است. محتویات میکروتیوب جهت انجام واکنش qRT-PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر آماده شد. میکروتیوب های آماده شده در دستگاه Corbett Rotor-Gene (6000 HRM) برای انجام واکنش qRT-PCR قرار گرفت. مراحل واکنش برای تکثیر ژنZrt1 در شرایط فعال سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت۱۰دقیقه، در ۴۰ سیکل (شامل واسرشت سازی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت۲۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت۳۰ ثانیه و بسط در دمای۷۲ درجه سلسیوس به مدت۲۰ ثانیه) و در نهایت بازه دمایی۶۰ تا ۹۵ درجه سلسیوس جهت تشکیل منحنی ذوب تنظیم شد. در انتها، آنالیز منحنی ذوب به منظور بررسی عملکرد اختصاصی پرایمرها برای تولید محصول مورد نظر و همچنین عدم شکل گیری پرایمر-دایمر در نظر گرفته شد. تمام واکنش ها بصورت سه بار تکرار انجام شد و نتایج براساس مقادیر سیکل آستانه (Ct) تجزیه و تحلیل شد. محتویات ویال مورد استفاده در واکنش qRT-PCR شامل۱۲/۵ میکرولیترمسترمیکس سایبرگرین، ۲ میکرولیتر نمونه cDNA،۸/۵ میکرولیتر آب DEPC، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse بود .

رسم شبکه پروتئینی برای شناسایی ژن های مرتبط با ژن Zrt1: برای بررسی بیشتر ژن Zrt1 در مخمر *S. cerevisiae* در مرحله آخر به کمک نرم افزارهای بیوانفورماتیک، شبکه پروتئینی مربوط به *S. cerevisiae* که در آن ژن کدکننده پروتئینZrt1 بهمراه پروتئین های دیگر که نزدیک ترین رابطه همکاری در واکنش های سیگنالدهی سلولی را با پروتئینZrt1 دارند، شناسایی شد. سپس آنالیزهای نهایی بر روی این شبکه انجام گرفت.

رسم شبکه پروتئینی. برای بدست آوردن شبکه پروتئینی از پایگاه داده STRING (http://string-db.org) استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا صفحه مورد نظر بر روی بخش شناسایی تک پروتئین تنظیم شد، سپس اسم پروتئین مورد نظر یعنی پروتئینZrt1 در بخش مربوطه نوشته شد و قسمت انتخاب ارگانیسم بر روی *S. cerevisiae* تنظیم شد. پس از این مرحله و شناسایی پروتئین مورد نظر توسط پایگاه داده در انتها شبکه پروتئینی مربوط به Zrt1 به دست آمد. شکل مربوط به شبکه ذخیره شد. همچنین فایل مربوط به آنالیز شبکه با فرمت tsv ذخیره شد تا برای آنالیزهای بعدی استفاده گردد.

آنالیز شبکه. فایل tsv به دست آمده از مرحله قبل در نرم افزار Cytoscape v3.7.0 (http://cytoscape.org/) قرار داده شد تا به کمک برنامه های متنوع موجود در آن آنالیز شبکه صورت گیرد. در این بخش، برنامه Network

Analyzer که یک برنامه بارگذاری شده در نرم افزار Cytoscape می باشد، برای آنالیز شبکه به کار برده شد. به این ترتیب که ابتدا در قسمت بالای صفحه در بخش tools برنامه Network Analyzer را انتخاب کرده و با روشن کردن گزینه Analyze Network و سپس انتخاب گزینه treat the network as undirected نتایج آنالیز شبکه براساس پارامترهای مختلف ارائه می شود، که معمولا از دو پارامتر اصلی Degree وBetweeness centrality برای بررسی نتایج استفاده می گردد.

خوشه بندی شبکه. برای خوشه بندی شبکه مورد نظر از Clusterviz که یکی دیگر از برنامه های بارگذاری شده در نرم افزار Cytoscape می باشد، استفاده شد. این نرم افزار براساس الگوریتم MCODE موجود در Cytoscape شبکه را به خوشه های کوچکتری تقسیم می کند تا پروتئین های مهم موجود در شبکه با دقت بیشتری تعیین شود. بعد از آنالیز شبکه با این روش عموما خوشه های موجود در شبکه به همراه پروتئینی که نقش هسته اصلی را در خوشه مورد نظر دارد، براساس پارامترهای تعریف شده در الگوریتم نشان داده می شود.

آنالیز آماری: در مطالعه حاضر، تمام اندازه گیری ها سه بار انجام شد و نتایج بدست آمده میانگین این سه تکرار بوده است. برای تجزیه و تحلیل اولیه داده های Ct از نرم افزار REST 2009 استفاده شد. همچنین نرم افزار GraphPad Prism 8 برای آنالیز جامع داده ها بکار برده شد. آنالیز داده ها با روش ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و داده های عددی به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد. همچنین مقادیر معناداری p بصورت زیر نمایش داده شدند:

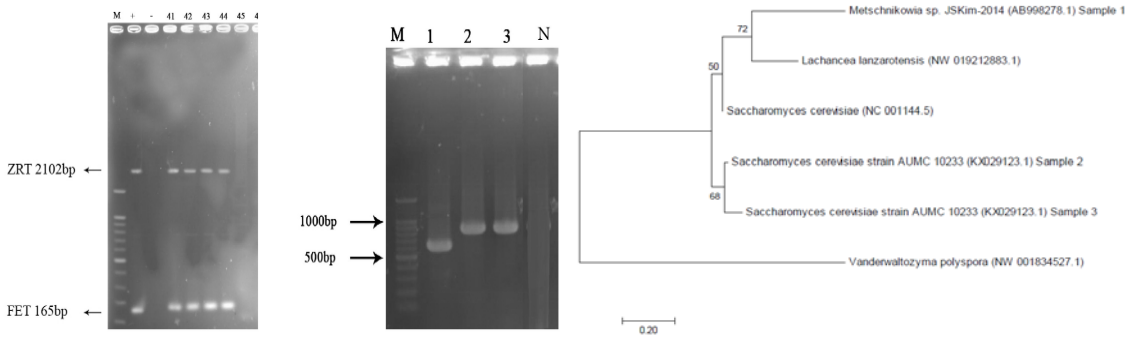
$*p < 0.05$, $**p < 0.01$, and $***p < 0.001$

نتایج

شناسایی مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و ملکولی مخمر *S. cerevisiae* : از فاضلاب کارخانه الکل سازی سیمین تاک در سه نوبت نمونه برداری شد تا بدین ترتیب خطای در نمونه گیری کمتر و اماکن جمع آوری مخمر مورد نظر بیشتر باشد. نمونه فاضلاب جمع آوری شده که مراحل جداسازی، فیلتراسیون و کشت بر روی دو محیط YPD و SDB را طی کرده بودند، برای جداسازی و بررسی مورفولوژیکی و بیوشیمیایی مخمر *S. cerevisiae* استفاده شدند. کلنی های مخمرها از نظر سطح و شکل ظاهری مورد توجه قرار گرفتند، همچنین پس از رنگ آمیزی با کریستال ویوله، در زیر میکروسکوپ نیز تصویر مخمرها مشاهده شد. در بررسی بیوشیمیایی مخمرها نیز، قابلیت تخمیر قندهای گلوکز، آرابینوز، مالتوز، رافینوز، گالاکتوز و سوکروز و همچنین عدم تخمیر قندهای لاکتوز، مانیتول، زایلوز و سلبیوز مورد توجه قرار گرفت و نتایج براساس اطلاعات موجود در کتاب تاکسونومی مخمرها بررسی شد (۱۰). سپس برای تایید بیشتر نمونه ها از بررسی ملکولی استفاده شد.

پس از بررسی مورفولوژیکی و بیوشیمیایی مخمر برای شناسایی دقیق تر مخمر *S. cerevisiae* ، روش شناسایی ملکولی مخمر و رسم درخت فیلوژنی بکار گرفته شد. ابتدا واکنش PCR به کمک پرایمرهای ITS1 وITS4 برای تکثیر ژن 18srRNA مخمر استفاده شد. نتایج نشان داد که ۳ مخمر شناسایی شده در بررسی مورفولوژیکی و بیوشیمیایی بعنوان مخمر *S. cerevisiae* الگوی باند مربوط به ژن 18srRNA را نشان دادند (باند مورد نظر در محدوده 500-1000 bp مشاهده شد). محصول PCR این ۳ مخمر توسط شرکت Bioneer در کشور کره توالی یابی شد و توالی خوانده شده در بخش بلاست پایگاه اطلاعاتی NCBI مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج نشان داد که توالی قطعه 18srRNA در ۲ نمونه از این ۳ مخمر بیشترین مشابهت را با مخمر *S. cerevisiae* دارند و این ۲ نمونه مخمر، هر دو سویه یکسانی از مخمر *S. cerevisiae*

بودند، لذا ادامه مراحل کار بر روی این سویه از مخمر *S. cerevisiae* انجام شد(شکل ۲).



شکل۲- A الگوی باند ژن 18srRNA بر روی ژل آگارز. M: مارکر، ۳-۱: شماره نمونه های مخمر که همگی الگوی باند مورد نظر را نشان دادند B. تصویر درخت فیلوژنی از ۳ نمونه مخمر تعیین توالی شده. نمونه ۲ و ۳ به عنوان سویه ای از مخمر *S. cerevisiae* شناسایی شدند

بررسی میزان رشد مخمر *S. cerevisiae* تحت تاثیر غلظت های مختلف فلز روی: مخمرهای بدست آمده از پساب کارخانه تولید الکل که با بررسی مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و ملکولی به عنوان سویه ای از *S. cerevisiae* شناخته شدند، در بررسی اثر غلظت های مختلف روی بر میزان رشد و تولید بیومس مخمر *S. cerevisiae* ، مورد مطالعه قرار گرفتند.

به محیط های کشت SDB که با غلظت های مختلف $ZnSO_4$ شامل۰ ، ۲۵ ، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم برمیلی لیتر تیمار شده بودند، سوسپانسیون *S. cerevisiae* حاوی مقدار تقریبی $۱/۵ \times ۱۰^{۷}$ سلول در میلی لیتر (مخمرها در این مرحله در فاز لگاریتمی از رشد خود قرار داشتند) تلقیح شدند. در حالی که کلیه محیط های کشت در شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس و سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شده بودند، رشد مخمر در فواصل ۲۴ ساعته (۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲) تخمین زده شد. OD سوسپانسیون هر محیط کشت (ترکیبی از محیط کشت SDB حاوی روی به همراه مخمر) با استفاده از روش طیف سنجی در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شد، تا میزان رشد مخمر در زمان معین مشخص شود. نتایج نشان داد که بیشترین رشد در محیط کشت تیمار شده با ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر از غلظت $ZnSO_4$ و در مدت زمان ۲۴ ساعت گرماگذاری پس از تلقیح مخمر اتفاق افتاده است. در واقع نتایج گویای این مطلب بود که رشد مخمر *S. cerevisiae* در محیط کشت حاوی غلظت های مختلف روی در طی مدت۲۴ساعت گرماگذاری، پس از تلقیح مخمر به محیط کشت، به صورت تدریجی افزایش یافت. اما پس از عبور از زمان ۲۴ساعت روند رشد به صورت یکنواخت باقی ماند و افزایش زمان گرما گذاری بر میزان رشد مخمر تاثیرگذار نبود. این در حالی بود که بیشترین میزان رشد در زمان ۲۴ ساعت گرماگذاری پس از تلقیح مخمر و در حضور ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر روی در محیط مشاهده شد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان وزن مرطوب و خشک مربوط به نمونه تیمار شده با ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر از غلظت روی در زمان ۲۴ساعت گرماگذاری پس از تلقیح مخمر بوده است و این مشاهده نتایج طیف سنجی را تایید کرد.

بدین ترتیب با استفاده از طیف سنجی و اندازه گیری بازده وزنی توده زیستی، تاثیر غلظت های مختلف فلز روی بر میزان رشد *S. cerevisiae* مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱).

بررسی تغییرات بیان ژن Zrt1 در مخمر *S. cerevisiae* تحت تاثیر روی جذب شده: از آنجا که برآورد نرخ رشد و سنجش محتوای توده زیستی خشک، در طی رشد در

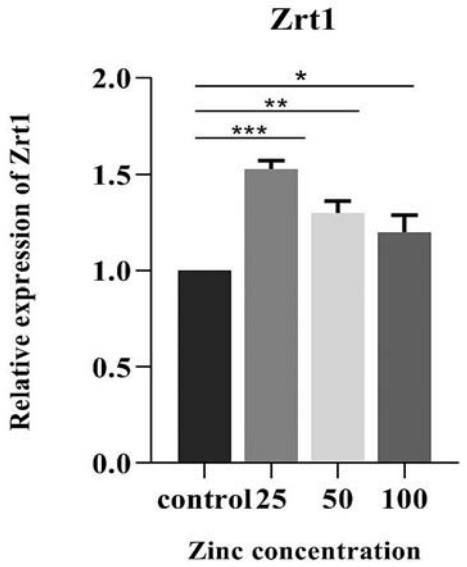
غلظت های مختلف روی موجود در محیط کشت، نشان داد که بیشترین میزان رشد مخمر در مدت ۲۴ساعت گرماگذاری پس از تلقیح مخمر اتفاق می افتد.

جدول ۱- OD بدست آمده از غلظت های مختلف فلز روی در طول موج ۶۰۰ نانومتر و بازده وزنی *S. cerevisiae* در حجم۲۰۰ میلی لیتر از محیط کشت در غلظت های مختلف روی

OD بدست آمده از غلظت های مختلف فلز روی				
$ZnSO_4$ میکروگرم بر میلی لیتر	۰ ساعت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
۰	۰/۰۱۴	۱/۹۴۷	۱/۹۹۶	۱/۹۸۵
۲۵	۰/۰۲۰	۲/۵۲۰	۲/۴۵۰	۲/۴۴۰
۵۰	۰/۰۲۴	۲/۰۰۵	۲/۰۰۰	۲/۰۷۰
۱۰۰	۰/۰۳۰	۲/۰۰۵	۲/۰۱۰	۲/۰۳۵

بازده وزنی S. cerevisiae در غلظت های مختلف روی							
$ZnSO_4$ میکروگرم بر میلی لیتر	۲۴ساعت		۴۸ ساعت		۷۲ساعت		
	وزن مرطوب	وزن خشک	وزن مرطوب	وزن خشک	وزن مرطوب	وزن خشک
۰	۰/۳۴	۰/۰۰۵۱	۰/۳۹	۰/۰۰۵۵	۰/۳۹	۰/۰۰۵۷
۲۵	۰/۶۱	۰/۰۱۰۳	۰/۵۸	۰/۰۰۹۹	۰/۴۱	۰/۰۰۶۱
۵۰	۰/۴۶	۰/۰۰۸۰	۰/۵۵	۰/۰۰۸۶	۰/۴۲	۰/۰۰۷۵
۱۰۰	۰/۴۷	۰/۰۰۸۹	۰/۵۶	۰/۰۰۸۷	۰/۴۴	۰/۰۰۷۹

لذا به بررسی تغییرات بیان ژن Zrt1 تحت تاثیر غلظت های مختلف روی در زمان ۲۴ ساعت گرماگذاری پس از تلقیح مخمر پرداخته شد. به این ترتیب که پس از استخراج RNA از مخمرهای هر گروه و طی کردن مراحل سنتز cDNA ، تاثیر روی جذب شده بر میزان بیان ژن مورد نظر در مخمر *S. cerevisiae* با روش qRT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیان ژن Zrt1 تحت تاثیر غلظت های مختلف روی موجود در محیط کشت، در مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری پس از تلقیح مخمر، در مقایسه با گروه کنترل (گروهی که غلظت روی در محیط کشت صفر بوده است به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد)، بیان متفاوتی داشته است. این تفاوت در هر۳ گروه نسبت به گروه کنترل معنادار بوده و مقادیرp در غلظت های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب ۰/۰۰۱>، ۰/۰۱> و۰/۰۵> بود. با وجود افزایش بیان معنادار ژن Zrt1 در هر۳ گروه آزمایشی نسبت به گروه کنترل، بیشترین افزایش بیان این ژن در غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر مشاهده شد و با دو برابر شدن غلظت روی در محیط کشت، بیان این ژن کاهش یافت. این گونه نتیجه گرفته شد که بیشترین میزان بیان ژنZrt1 در زمانی اتفاق می افتد که محدودیت روی محیطی وجود دارد و با افزایش غلظت روی در محیط میزان بیان آن کاهش می یابد(شکل۳).

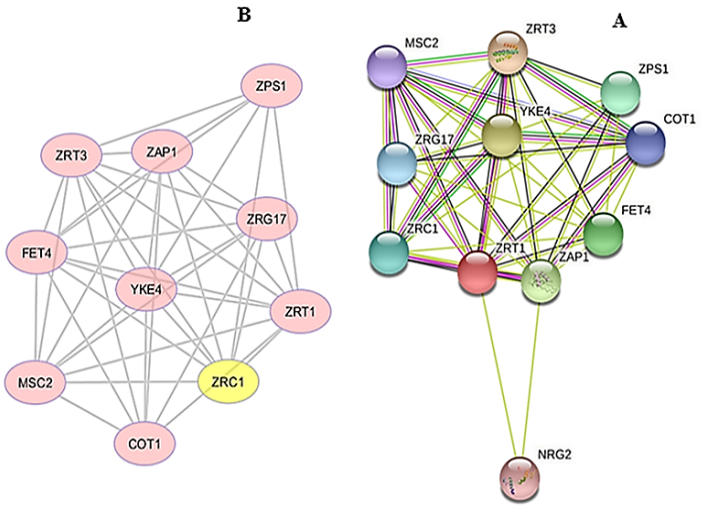


شکل۳- تغییرات بیان ژن Zrt1 تحت تاثیر غلظت های مختلف روی (۰ ، ۲۵ ، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) موجود در محیط کشت. غلظت ۰ به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شده است *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001)

از مجموع این مشاهدات این گونه نتیجه گرفته شد که غلظت روی موجود در محیط کشت، همان طور که بر

میزان نرخ رشد و بیومس به دست آمده از سلول مخمر موثر بوده است، بر میزان بیان ژن های مرتبط با روی از جمله Zrt1 که از ناقلان روی در سلول مخمر می باشد، تاثیر گذار است. در واقع در شرایط افزایش روی محیطی بیان این ژن افزایش می یابد تا با تولید پروتئین ناقل، جذب روی محیطی توسط مخمر افزایش یابد. اما این افزایش کاملا به میزان غلظت روی محیطی وابسته است و همان طور که در شکل۳ مشاهده شد، این افزایش بیان در محدود ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر، توسط مخمر قابل قبول بود. ولی افزایش بیشتر غلظت روی محیطی نه تنها اثر افزاینده ای بر بیان این ژن نداشته است، بلکه سبب کاهش بیان آن نیز شده است.

بررسی شبکه پروتئینی مرتبط با ژن Zrt1 موجود در مخمر *S. cerevisiae* : پس از اندازه گیری تغییرات بیان ژن Zrt1 در مخمر *S. cerevisiae* تحت تاثیر غلظت های مختلف روی محیطی، برای بررسی بیشتر این ژن، مطالعه بیوانفورماتیک شبکه پروتئینی مربوط به *S. cerevisiae* در ارتباط با پروتئین Zrt1 صورت گرفت. به این ترتیب که ابتدا شبکه پروتئینی مورد نظر از پایگاه داده STRING استخراج شد (شکل۴) و سپس به کمک نرم افزار Cytoscape با استفاده از برنامه Network Analyzer آنالیز شبکه صورت گرفت. نتایج آنالیز شبکه براساس دو پارامتر اصلی Degree و Betweeness centrality ارائه شد. در پایان نیز برای تقسیم بندی دقیق تر ژن ها خوشه بندی شبکه به کمک الگوریتم MCODE صورت گرفت.



شکل ۴- A شبکه پروتئینی پیش بینی شده برای ژن Zrt1. B خوشه به دست آمده از شبکه پروتئینی. ژن نشان داده شده با رنگ زرد به عنوان هسته مرکزی خوشه شناسایی شده است.

همان طور که در شکل A.۴ نشان داده شده است، شبکه به دست آمده دارای ۱۱ ژن بود. هر گلوله در شکل نشان دهنده یک ژن و هر خط میان دو ژن نشان دهنده یک ارتباط میان این دو ژن است. در تعریف شبکه پروتئینی هر ژن یک گره و هر خط ارتباط، یک یال نامیده می شود. بنابراین هرچه تعداد گره ها در شبکه بیشتر باشد، نشان دهنده اینست که در شبکه پروتئینی مورد بررسی ژن های بیشتری نقش دارند و هرچه تعداد یال های میان ژن ها بیشتر باشد، به معنای ارتباط تنگاتنگ میان ژن ها در شبکه است. خوشه بندی شبکه با استفاده از الگوریتم MCODE و براساس ۳ پارامتر (Degree Cutoff: 2, K-Core: 2, Node Score Cutoff: 0.2)، نشان داد که این شبکه پروتئینی دارای یک خوشه تشکیل شده از ۱۰ ژن (گره) می باشد که در میان آنها ژن ZRC1 بعنوان هسته مرکزی

خوشه شناخته می شود (شکلB.۴). آنالیز شبکه به کمک برنامه Network Analyzer ژن های موجود در شبکه را براساس پارامترهای Degree و Betweeness centralityترتیب بندی کرد، که این ترتیب بندی ها نشان دهنده درجه اهمیت ژن ها در شبکه است. به کمک پارامتر Degree ۱۰ درصد اول ژن های موجود در این ترتیب بندی بعنوان Hub شناخته می شوند و براساس پارامتر Betweeness centrality ۱۰ درصد اول ژن های موجود در این ترتیب بندی بعنوان Bottleneck شناخته می شوند. Hub در شبکه به ژن هایی گفته می شود که بیشترین ارتباط را با ژن های دیگر دارند و Bottleneck به ژن هایی گفته می شود که در کوتاه کردن مسیر برای ارتباط میان سیگنالدهی های مختلف نقش دارند. لذا برای بررسی یک شبکه پروتئینی هر دو پارامتر در نظر گرفته می شود. چرا که بسته به نوع شبکه ممکن است میزان اهمیت هرکدام از این دو پارامتر متفاوت باشد. با توجه به نتایج ارائه شده در جدول۲ براساس آنالیز به دست آمده، و نیز تعریف Hub و Bottleneck در شبکه پروتئینی، ژن Zrt1 از هر دو نظر دارای بیشترین امتیاز بود، که نشان دهنده اهمیت پروتئین آن در مسیر سیگنالدهی مربوط به انتقال روی محیطی به داخل سلول در مخمر *S. cerevisiae* می باشد.

جدول ۲- ترتیب بندی ژن های موجود در شبکه پروتئینی براساس پارامترهای اصلی

نام ژن	Degree	نام ژن	Betweeness centrality
ZRT1	۱۰	ZRT1	۰/۱۰۳۹۱۵
ZAP1	۱۰	ZAP1	۰/۱۰۳۹۱۵
YKE4	۹	YKE4	۰/۰۱۵۰۲۶
ZRT3	۹	ZRT3	۰/۰۱۵۰۲۶
FET4	۹	FET4	۰/۰۱۵۰۲۶
ZRC1	۸	MSC2	۰/۰۰۷۴۰۷
MSC2	۸	ZRG17	۰/۰۰۳۱۷۵
ZRG17	۸	ZRC1	۰/۰۰۳۱۷۵
COT1	۷	COT1	۰
ZPS1	۶	ZPS1	۰
NRG2	۲	NRG2	۰

بحث و نتیجه گیری

در میان مطالعات انجام شده برای شناسایی هرچه بهتر میکروارگانیسم های مناسب با توانایی بالا در جذب زیستی فلزات و به دنبال آن رفع آلودگی پسماندها به منظور حفظ سلامت محیط زیست، مطالعات قابل توجهی بر روی مخمر *S. cerevisiae* صورت گرفته است، که نشان دهنده اهمیت آن برای رسیدن به این هدف می باشد. در مطالعه ای در سال ۱۹۸۷ نشان داده شد که این مخمر قادر به برداشت و جذب روی از محیط خارج سلولی و ذخیره و توزیع آن در ساختارهای سازمان یافته از جمله واکوئل ها می باشد. این مکانسیم عبور از غشای پلاسمایی و جداره واکوئل ها از طریق انتقال دهنده های خاص و وابسته به انرژی است و با این مکانیسم، مخمر قادر به مقاومت و کاهش سمیت روی در محیط حاوی روی نسبت به دیگر فلزات می باشد(۲۷). مکانیسم جذب فلز در *S. cerevisiae* از طریق یک روند پیچیده، تحت شرایط خاصی اتفاق می افتد. پارامترهای بسیاری بر جذب روی توسط سلول های مخمر تأثیر گذار است. از این میان می توان به فیزیولوژی سلول، خصوصیات سطح سلول و همچنین شیمی یون های فلزی و اثرات فیزیکوشیمیایی محیط اشاره کرد(۴). مطالعه انجام شده بر روی جذب فلزات سنگین از فاضلاب صنایع چرم سازی، توسط مخمر *S. cerevisiae* نشان داد که این مخمر چه بصورت زنده و چه بصورت غیرزنده قادر به جذب فلزات سنگین است. همچنین مشاهده شد که پارامترهای مهمی از جمله غلظت فلزات سنگین، pH محیط کشت، مدت زمان گرماگذاری و حتی میزان تلقیح مخمر نقش حیاتی در کارایی جذب فلزات توسط مخمر دارند(۱۹).

در یک مطالعه تاثیر سه نوع نمک روی شامل نیترات روی، سولفات روی و کلراید روی بر میزان بازده *S. cerevisiae* همچنین تفاوت جذب این سه نوع نمک توسط سلول های مخمر، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که

غلظت‌های ۰، ۲۵،۵۰،۱۰۰ میلی گرم از هر سه نوع نمک روی مذکور، میزان بازده توده زیستی مخمر را تغییر نمی دهد و میزان توده زیستس بدست آمده ۰/۹۹ – ۱/۱۹ گرم توده زیستی خشک مخمر در ۱۰۰ میلی لیتر محیط YPDبود. در این تحقیق همچنین نشان داده شد که غلظت های بالای روی در حدود ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم منجر به مرگ سلول های مخمر می شود(۲۱). آزاد و همکارانش در سال ۲۰۱۴، موفق به تولید توده زیستی *S. cerevisiae* غنی شده با روی جهت استفاده بعنوان مکمل غذایی برای انسان و حیوانات شدند. مشاهدات آنها نشان داد که غلظت سولفات روی افزوده شده به محیط رشد مخمر بطور مشخصی می تواند بر میزان تجمع روی در سلول ها و همچنین رشد سلول مخمر تاثیر بگذارد(۴).

در مطالعه حاضر، ما از غلظت های مختلف فلز روی (۰، ۲۵،۵۰،۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در محیط کشت SDB استفاده کردیم، تا غلظت اپتیمم روی را برای رسیدن به میزان بالایی از توده زیستی مخمر و جذب روی، بدست آوریم. بطور همزمان، اثر زمان گرماگذاری نیز بر رشد مخمر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که افزایش زمان گرماگذاری بیش از ۲۴ ساعت، تأثیر مثبتی بر جذب روی ندارد (جدول۱). حداکثر میزان توده زیستی خشک و همچنین بیشترین سرعت رشد مخمر نیز در غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر روی در محیط SDB و بعد از ۲۴ ساعت گرماگذاری مشاهده شد (جدول۱). بنابراین، این گونه نتیجه گرفته شد که مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری در حضور روی محیطی با غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر زمان مناسب و غلظت اپتیمم روی برای رشد *S. cerevisiae* می باشد.

جذب روی به داخل سلول ها و انتقال آن به داخل و خارج اندامک های داخل سلولی نیاز به ناقلان پروتئینی دارد که به غشاهای این اندامک ها برای تسهیل در حرکت روی کمک می کنند. در مطالعه ای که بر روی جزئیات تنظیم مولکولی برداشت فلز روی در مخمر *S. cerevisiae* صورت گرفت، مشاهده شد که برداشت روی در مخمر وابسته به دو ژن Zrt1 و Zrt2 است، که هر دو متعلق به خانواده ZIP می باشند. همچنین مشاهده شد که Zrt1 در هنگام کمبود روی فعال می شود، ولی فعال شدن Zrt2 هنگامی صورت می گیرد که میزان روی در محیط نرمال باشد. در این مطالعه تنظیمات مختلف این دو ژن در مقادیر مختلف روی نیز مورد بررسی قرار گرفت(۲۷). در سال ۲۰۰۸آزمایشات Tamura و همکارانش نشان داد که حذف ژن Zrt1 به شدت رشد مخمر *S. cerevisiae* را در محیط کشت مهار می کند و این نقص را می توان با دو برابر کردن مقدار یون فلز روی در محیط برطرف کرد. آنها پیشنهاد کردند که فلز روی می تواند فاکتور محدود کننده رشد در جهش یافته های zrt1Δ و zrt1Δzrt2Δ باشد. همچنین این تحقیق نشان داد که Al^{3+} موجب افزایش تجمع فلز روی در موتانت zrt1Δ می شود و در فقدان Al^{3+}اضافی، کمبود روی در مخمر مشاهده می گردد (۲۳).

ما نیز در مطالعه خود به بررسی تغییرات سطح بیانZrt1 بعنوان ناقل مهم روی، در پاسخ به غلظت روی محیطی و مدت زمان گرماگذاری ۲۴ ساعته *S. cerevisiae* در محیط SDB، در مقایسه با محیط شاهد (محیط SDB فاقد روی) پرداختیم. نتایج بدست آمده نشان داد که حداکثر میزان بیان ژن Zrt1 نسبت به گروه های دیگر در غلظت ۲۵میکروگرم بر میلی لیتر روی اتفاق می افتد. در واقع بیشترین میزان بیان ژن Zrt1 در زمانی اتفاق می افتد که محدودیت روی محیطی وجود دارد و با افزایش غلظت روی در محیط میزان بیان آن کاهش می یابد (شکل۳). از این رو، مشاهدات ما مطابق با مطالعه قبلی است که بیان می کند، جذب روی خارج سلولی توسط *S. cerevisiae* در محدودیت شدید روی، با استفاده از ناقل روی با افینیتی بالا، یعنی Zrt1 صورت می گیرد(۶).

در سال ۲۰۱۳ مطالعه ای بر روی Zrt1 به عنوان یکی از ژن های موثر در برداشت روی انجام شد. این مطالعه فراوانی و پلی مورفیسم غیرمترادف انواع ژن های دیگر موثر در برداشت روی و ایجاد تعادل در میزان روی در *S. cerevisiae* را نیز مورد بررسی قرار داد. نتایج نشان داد که در ایجاد تعادل درون سلولی، همچنین برداشت و انباشت فلز روی بیش از ۵ ژن دخالت دارند، که به موجب آنها پلی مورفیسم های بسیاری در برداشت روی در این مخمر دخیل هستند. این ژن ها شامل Zrt1، Zrt2، Fet4، Pho84 ، Cot1 و چندین ژن دیگر می باشند. در نهایت نتیجه گرفته شد که میزان فلز روی موجود در محیط، عاملی بالقوه در تخمین فراوانی انتخاب مثبت در بیان این ژن های مخمر می باشد(۸). همچنین در تحقیق دیگری مشاهده شد که همانند دیگر ناقلان، Zrt1 هنگامی که *S. cerevisiae* در معرض غلظت بالای روی محیطی قرار می گیرد، از غشای پلاسمایی حذف می شود(۲۰). در مطالعه حاضر ما نیز به کمک رسم شبکه پروتئینی توانستیم ژن های موجود در *S. cerevisiae* که نزدیک ترین رابطه را با پروتئین Zrt1 داشتند و در مسیرهای سیگنالدهی درون سلولی این مخمر ازجمله مسیرهای موجود جهت انتقال روی محیطی به داخل سلول شرکت داشتند، شناسایی کنیم (شکل۴.A). نتایج آنالیز این شبکه پروتئینی نشان داد که Zrt1 دارای بیشترین درجه از لحاظ اهمیت و تقابل با دیگر پروتئین های موجود در شبکه بوده است. قابل ذکر است که Fet4 و Cot1 که در مطالعه انجام شده در سال ۲۰۱۳ به عنوان ناقلان روی در *S. cerevisiae* گزارش شده بودند نیز در شبکه گفته شده مشاهده شدند. لذا پیشنهاد می شود تا در مطالعات بعدی جهت بررسی دقیق تر شرایط اپتیمم برای جذب روی بعنوان یکی از فلزات سنگین موجود در پسماندهای صنعتی، سایر ژن های این شبکه به ویژه Fet4 و Cot1 و نیز Zrc1 که به عنوان هسته اصلی در خوشه بندی از شبکه شناسایی شد (شکل۴.B)، پرداخته شود.

علاوه بر توانایی و قابلیت میکروارگانیسم ها در جذب فلزات، تولید پروتئین تک یاخته توسط این میکروارگانیسم ها نیز توجه محققان را به خود جلب کرده است. در مطالعه ای که بر روی پساب حاوی نشاسته صورت گرفت، مشخص شد که می توان سویه های مخمر *S. cerevisiae* را از آن جداسازی کرد و این مخمر قادر به مصرف نشاستهٔ محلول و خام است و می تواند از آنها برای تولید پروتئین تک یاخته استفاده کند(۱۶). در مطالعه دیگری که به منظور استفاده از مخمرها در جهت تولید پروتئین تک یاخته از امعاء و احشاء ماهیان صورت گرفت، مشخص شد که مخمر *S. cerevisiae* موجود در باقیمانده امعاء و احشاء ماهیان می تواند جهت تولید پروتئین تک یاخته استفاده شود. الگوی کشت مورد استفاده در این تحقیق از نوع هوازی بود که در شرایط بسته و در دو مقیاس آزمایشگاهی و تخمیری انجام شد. نتایج نشان داد که شرایط مطلوب رشد مخمرها، همچنین استفاده از فرمانتور مناسب، سبب تولید درصد بالایی از پروتئین تک یاخته حاصل از پساب ضایعات ماهی می شود که بعنوان مکمل غذایی در غذای دام، طیور و آبزیان قابل استفاده است(۲۲).

میکروارگانیسم ها به عنوان جاذب های زیستی به راحتی در دسترس هستند و برای جذب فلزات سنگین در غلظت های بسیار کم نیز کاملا کارآمد می باشند. منطق استفاده از میکروارگانیسم ها برای جذب فلزات سنگین اینست که آنها توده زیستی هستند که بطور گسترده قسمت زیادی از کره زمین را تشکیل می دهند، در حالی که از نظر اندازه بسیار کوچکند. همچنین میکروارگانیسم ها قابلیت رشد در شرایط کنترل شده را دارند و در مقابل تغییرات محیطی قابل انعطافند(۱۵). همه این ویژگی ها در کنار توانایی میکروارگانیسم ها به ویژه مخمرها در استفاده از فلزات جذب شده توسط آنها در جهت تولید توده زیستی کارآمد که می تواند علاوه بر سم زدایی از پسماندها و پاکسازی محیط به عنوان بیومسی غنی از فلزات در جهت غنی سازی هدفمند غذای انسان ها و خوراک دیگر جانوران

استفاده شود(۱۱)، اهمیت مطالعاتی نظیر مطالعه حاضر را برای دست یابی به شرایط بهینه برای تولید بهینه چنین میکروارگانیسم هایی نشان می دهد. مطالعه حاضر بر روی مخمر *S. cerevisiae* بدست آمده از پساب کارخانه تولید الکل بمنظور بررسی شرایط بهینه رشد این مخمر در حضور فلز روی و با تاکید بر نقش پروتئین Zrt1 که یک پروتئین ناقل روی در شرایط کمبود روی می باشد، متمرکز شده بود. نتایج حاصل از مطالعه، قابلیت و اهمیت این پروتئین را در جذب روی به ویژه در شرایط کمبود روی محیطی نشان داد. پیشنهاد می شود برای نتیجه گیری بهتر در مطالعات بعدی مواردی نظیر: بررسی دیگر فاکتورهای موثر بر رشد مخمر و جذب روی توسط مخمر، مقایسه تاثیر شرایط هوازی و بی هوازی بر رشد مخمر و در نتیجه میزان تولید توده زیستی، بررسی تاثیر فاکتورهای مختلف بر بیان دیگر ژن های موثر در جذب روی از جمله Zrt2 و Pho84 و تاثیر آنها بر رشد مخمر، تهیه پروتئین تک یاخته غنی شده با روی و آهن توسط مخمر *S. cerevisiae* و بررسی کارایی مخمر *S. cerevisiae* برای جذب روی در فاضلاب حاوی عناصر مختلف، مورد توجه قرار گیرد.

منابع

۱- شیخی، رستمی، آذین، اسداللهی، ابراهیمی. بهبود تولید و مقاومت به اتانل در مخمر ساکارومایسس سرویزیه با راهبرد مهندسی تکاملی با استفاده از تنش ۱-بوتانل. پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). ۲۰۲۱.

۲- فرامرزی، انزابی، یونس، مالمیری ج، هدا. اثر تغییرات مقدار ملاس و سلنیوم بر رشد مخمر ساکارومایسس سروزیه و میزان بیواتانول تولیدی. پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). ۲۰۲۰، ۳۳(۴): ۶۲۶-۳۹.

3- Andreini C, Banci L, Bertini I, Rosato A. Zinc through the three domains of life. Journal of proteome research. 2006;5(11):3173-8.

4- Azad SK, Shariatmadari F, Torshizi MK. Production of zinc-enriched biomass of Saccharomyces cerevisiae. Journal of Elementology. 2014;19(2)

5- Cerezer VG, Bando SY, Pasternak J, Franzolin MR, Moreira-Filho CA. Phylogenetic analysis of Stenotrophomonas spp. isolates contributes to the identification of nosocomial and community-acquired infections. BioMed research international. 2014;2014.

6- Eide DJ. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. 2006;1763(7):711-22.

7- Ellis CD, MacDiarmid CW, Eide DJ. Heteromeric protein complexes mediate zinc transport into the secretory pathway of eukaryotic cells. Journal of Biological Chemistry. 2005;280(31):28811-8.

8- Engle EK, Fay JC. ZRT1 harbors an excess of nonsynonymous polymorphism and shows evidence of balancing selection in Saccharomyces cerevisiae. G3: Genes, Genomes, Genetics. 2013;3(4):665-73.

9- Gerwien F, Skrahina V, Kasper L, Hube B, Brunke S. Metals in fungal virulence. FEMS microbiology reviews. 2018;42(1): fux050.

10- Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T. The yeasts: a taxonomic study: Elsevier; 2011.

11- Lavens P, Sorgeloos P. The history, present status and prospects of the availability of Artemia cysts for aquaculture. Aquaculture. 2000;181(3-4):397-403.

12- Li E, Mira de Orduña R. A rapid method for the determination of microbial biomass by dry weight using a moisture analyser with an infrared heating source and an analytical balance. Letters in applied microbiology. 2010;50(3):283-8.

13- Massoud R, Hadiani MR, Hamzehlou P, Khosravi-Darani K. Bioremediation of heavy metals in food industry: Application of Saccharomyces cerevisiae. Electronic Journal of Biotechnology. 2019.۶۰-۳۷:۵۶;

14- Mello A, Napoli C, Murat C, Morin E, Marceddu G, Bonfante P. ITS-1 versus ITS-2 pyrosequencing: a comparison of fungal populations in truffle grounds. Mycologia. 2011;103(6):1184-93.

15- Mishra V. Biosorption of zinc ion: a deep comprehension. Applied Water Science. 2014;4(4):311-32.

16- Nahvi I, Shafiei R. Single cell protein production from raw starch in fed_batch culture by coculture of Cryptococcus aerius and Saccharomyces cerevisiae. Pajouhesh And Sazandegi. 2008.

17- North M, Steffen J ,Loguinov AV, Zimmerman GR, Vulpe CD, Eide DJ. Genome-wide functional profiling identifies genes and processes important for zinc-limited growth of Saccharomyces cerevisiae. PLoS Genet. 2012;8(6): e1002699.

18- Owolabi J, Hekeu M. Heavy metal resistance and antibiotic susceptibility pattern of bacteria isolated from selected polluted soils in Lagos and Ota, Nigeria. International Journal of Basic & Applied Sciences. 2014;14(6):6-12.

19- Porwal H, Mane A, Velhal S. Biodegradation of dairy effluent by using microbial isolates obtained from activated sludge. Water Resources and Industry. 2015;9:1-15.

20- Schothorst J, Zeebroeck GV, Thevelein JM. Identification of Ftr1 and Zrt1 as iron and zinc micronutrient transceptors for activation of the PKA pathway in Saccharomyces cerevisiae. Microbial Cell. 2017;4(3):74.

21- Sillerová S, Lavová B, Urminská D, Poláková A, Vollmannová A, Harangozo L. Preparation of zinc enriched yeast (Saccharomyces cerevisiae) by cultivation with different zinc salts. The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 2012;1:689-95.

22- Suman G, Nupur M, Anuradha S, Pradeep B. Single cell protein production: a review. Int J Curr Microbiol App Sci. 2015;4(9):251-62.

23- Tamura S, Yoshimura E. Promotion of Zn 2+ Uptake by Al 3 +in a Saccharomyces Cerevisiae Mutant that Lacks the ZRT1 Gene Encoding a High-Affinity Zn Transporter. Biological trace element research. 2008;124(3):262.

24- Ugalde U, Castrillo J. Single cell proteins from fungi and yeasts. Applied mycology and biotechnology. 2: Elsevier; 2002. p. 123-49.

25- Wang J, Chen C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. Biotechnology advances. 2009;27(2):195-226.

26- Wang J, Chen C. Biosorption of heavy metals by Saccharomyces cerevisiae: a review. Biotechnology advances. 2006;24(5):427-51.

27- WHITE C, GADD GM. The uptake and cellular distribution of zinc in Saccharomyces cerevisiae. Microbiology. 1987;133(3):727-37.

28- Yamasaki S, Sakata-Sogawa K, Hasegawa A, Suzuki T, Kabu K, Sato E, et al. Zinc is a novel intracellular second messenger. The Journal of cell biology. 2007;177(4):637-45.

29- Zhao H, Eide D. The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1996;93(6):2454-8.

30- Zhao H, Eide D. The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in Saccharomyces cerevisiae. Journal of Biological Chemistry. 1996;271(38):23203-10

In search of Zrt1 gene expression changes in *Saccharomyces cerevisiae* under different concentrations of zinc in medium

Saraei F.[1], Amin i K.[2], Haddadi A.[1] and Larypoor M.[3]

[1] Dept. of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, I.R. of Iran

[2] Dept. of Microbiology, Faculty of Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, I.R. of Iran

3 Dept. of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran.

Abstract

Background: The *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) is a unique microorganism in toxic metals biosorption. The extracellular uptake of zinc in *S. cerevisiae* is mediated by the high-affinity Zrt1 protein as zinc transporter. The aim of current study was to examination of Zrt1 gene expression level in the presence of zinc metal, in *S. cerevisiae* as an industrially important yeast strain. Methods: Yeast isolates, obtained from alcohol factory's effluent were filtered and grown in YPD (yeast extract-peptone-dextrose) medium as a specific medium for yeast growth. The PCR method and DNA sequencing was employed to identify *S. cerevisiae* yeasts strains. Then, growth rate of this yeast in present of different concentration of Zn^{2+}, was examined at 24-hour intervals (0, 24, 48, and 72 h), using spectrophotometry. The qRT-PCR technique was carried out to quantified expression level of Zrt1 in yeast cells under these conditions. Also, the protein-protein interaction (PPI) network of Zrt1 and its closely interacting genes, obtained from STRING database were analyzed using Network Analyzer (plugged in Cytoscape v3.7.0) to identify the most potentially effective genes. Results: In optimum conditions of 25 µg/ml of zinc after 24 h incubation, *S. cerevisiae* showed the maximum growth rate and expression level of Zrt1 as Zn transporter. Also, bioinformatics analyses identified Zrt1 as crucial gene in cell signaling pathway for zinc absorption by *S. cerevisiae.* Discussion: our study demonstrated that *S. cerevisiae*, obtained from industrial effluents, can be used to produce Zn-enriched biomass.

Key words: *S. cerevisiae*, Zinc, Zrt1, Biosorption